

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ТИРЕОГЛОБУЛИНУ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ИФА-АНТИ-ТГ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра
здравоохранения
Республики Беларусь
В.В. Колбанов
27.03.2006 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор предназначен для определения концентрации антител к тиреоглобулину (анти-ТГ) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа "in vitro".

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора

Конъюгат	1 мпр.*; 0,2 мл
Иммуносорбент	1 планшет
Калибровочные пробы (C ₀ -C ₅), в диапазоне концентраций анти-ТГ (0-1200) МЕд/мл (точные значения концентраций анти-ТГ указываются на этикетках микропробирок)	6 мпр. по 0,5 мл
Контрольная сыворотка (КС)	1 фл.
Буферный раствор для разведения (БРР)	1 фл., 60 мл
Концентрат буферного раствора для промывания планшета (КРП)	1 фл., 50 мл
Субстратный буферный раствор (СБР)	1 фл., 16 мл
Хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (хромоген ТМБ)	1 фл., 1,0 мл
Стоп-реагент	1 фл., 13 мл

Примечание: * мпр. – микропробирка.

2.2 Основные компоненты набора ИФА-АНТИ-ТГ – иммуносорбент и конъюгат.

Иммуносорбент представляет собой полистирольный планшет, в лунках которого сенсibilизирован тиреоглобулин.

Конъюгат представляет собой белок А, конъюгированный с пероксидазой хрена.

При внесении в лунки планшета образцов исследуемых сывороток антитела, специфические к тиреоглобулину, связываются с антигенами на твердой фазе, образуя иммунные комплексы антиген-антитело. Образовавшиеся комплексы выявляют при помощи конъюгата - белка А-пероксидаза хрена. После отмывания несвязавшихся компонентов в лунки планшета добавляют раствор субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена (3,3',5,5'-тетраметилбензидин – ТМБ).

Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (0,5 М раствор серной кислоты), и интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на спектрофотометре как величину оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм.

Величина ОП пропорциональна концентрации анти-ТГ в калибровочных пробах и в образце сыворотки крови. Чем выше содержание антител в образце сыворотки, тем выше интенсивность окрашивания.

2.3 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах: 40 неизвестных проб, 6 калибровочных проб, 1 пробы КС и 1 фоновой пробы (ФП) при использовании всех стрипов одновременно, всего 96 определений.

Набор рассчитан на 4 постановки иммуноферментного анализа: 1 постановка – 3 стрипа (24 лунки). Для каждой постановки необходимо построение новой калибровочной кривой и рекомендуется определение концентрации анти-ТГ в КС.

2.4 Набор позволяет определять концентрацию анти-ТГ в сыворотке крови человека в интервале от 10 до 1200 МЕд/мл.

2.5 Продолжительность анализа составляет 95 мин.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.2 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

3.3 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования. Образцы сывороток можно хранить при температуре (2-8)°С не более 48 ч после взятия пробы. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры не менее минус 20°С) не более двух раз. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником.

Необходимо помнить, что плазма крови, образцы с гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившиеся без замораживания не пригодны для анализа.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- необходимо использовать пипетки полуавтоматические со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

5.1 Фотометр типа "Multiskan EX" для измерения оптической плотности;

- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,025 до 2,000 мл (от 25 до 2000 мкл);
- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 0,3 мл (от 50 до 300 мкл);
- встряхиватель для планшетов типа "Mikro-shaker";
- вихревой смеситель типа ВП;
- магнитная мешалка типа ММ-5;
- стакан мерный вместимостью 25 и 1000 мл;
- ванночки для реагентов вместимостью 60 мл или чашки Петри;
- пробирки одноразовые с пробками вместимостью 3 мл;
- штатив для пробирок;
- клейкая пленка или крышка;
- бумага фильтровальная;
- перчатки хирургические резиновые;
- вода дистиллированная.

6 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

6.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при температуре (18-22)°С в течение 30 мин.

6.2 Жидкие калибровочные пробы готовы к использованию.

После вскрытия микропробирок растворы можно хранить при температуре (2-8)°С не более 2 месяцев; при температуре не менее минус 20°С - в течение всего срока годности.

6.3 Во флакон с КС внести 0,5 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать до полного растворения препарата, избегая образования пены.

Подготовленный к использованию раствор можно хранить при температуре (2-8)°С не более 3 сут; при температуре не менее минус 20°С - в течение всего срока годности.

6.4 Подготовка стрипов

Перед началом работы освободить необходимое количество стрипов от упаковочного пакета, вставить их в рамку. Стрипы, которые не используются в данной постановке, можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре (2-8)°С в течение трех месяцев.

6.5 Приготовление раствора для промывания планшета

Если КРП содержит кристаллы, его необходимо перед использованием прогреть при температуре (35-37)°С до полного растворения кристаллов.

Содержимое флакона с КРП интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с. В мерный стакан отобрать необходимый объем КРП, заданный количеством используемых стрипов (таблица 1), довести

дистиллированной водой до нужного объема и перемешать полученный раствор на магнитной мешалке.

Неиспользованный КРП можно хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

Раствор для промывания планшета можно хранить при температуре (2-8) °С не более 5 сут.

Таблица 1

Количество используемых стрипов	Раствор для промывания планшета		Раствор конъюгата в рабочем разведении		Проявитель	
	КРП, мл	Дистиллированная вода, до мл	Конъюгат, мл	БРР, мл	Хромоген ТМБ, мл	СБР, до мл
3	12,5	250	0,05	5	0,2	4
6	25	500	0,10	10	0,4	8
9	37,5	750	0,15	15	0,6	12
12	50	1000	0,20	20	0,8	16

6.6 Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении

ВНИМАНИЕ! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовят непосредственно перед использованием! Раствор хранению не подлежит!

В чистый стакан вместимостью 25 мл отобрать заданный количеством используемых стрипов объем БРР, внести необходимое количество конъюгата (таблица 1). Содержимое стакана тщательно перемешать, не допуская образования пены.

БРР после вскрытия флакона можно хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора, остаток конъюгата – при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

6.7 Приготовление проявителя

ВНИМАНИЕ! Раствор проявителя готовят непосредственно перед использованием в защищенном от света месте. Раствор хранению не подлежит!

В чистый стакан вместимостью 25 мл внести объем СБР, заданный числом используемых стрипов, и необходимый объем хромогена ТМБ (таблица 1). Смесь интенсивно перемешать в течение (30-40) с.

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор проявителя должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с раствором проявителя, отмывать без применения синтетических моющих средств. Использовать только новые наконечники.

СБР и хромоген ТМБ после вскрытия флаконов можно хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

6.8 Стоп-реагент готов к использованию. После вскрытия флакона раствор можно хранить при температуре (2-8)°С в течение всего срока годности.

6.9 Пробирки для разведения исследуемых образцов сыворотки крови человека и КС маркировать следующим образом: КС ' – контрольная сыворотка; №Х ' – исследуемые образцы сыворотки крови.

В пробирки, маркированные №Х ', внести по 0,025 мл (25 мкл) соответствующих исследуемых образцов сывороток крови. В пробирку, маркированную КС ', внести по 0,025 мл (25 мкл) КС.

Во все пробирки внести по 0,5 мл буферного раствора для разведения и перемешать, избегая образования пены. При определении концентрации анти-ТГ этот фактор разведения не учитывается, т.к. он учтен при построении калибровочной кривой.

Если предполагается высокая концентрация анти-ТГ в исследуемом образце сыворотки крови (выше 1200 МЕд/мл), образцы следует предварительно развести буферным раствором для разведения в 10 раз. После проведения анализа результат необходимо умножить на коэффициент разведения (10).

7 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВАНИЮ ПЛАНШЕТА

7.1 Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматический или полуавтоматический промыватель – вошер; в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них; лунки должны заполняться до краев (0,2-0,3 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;

- необходимо выдерживать лунки заполненными раствором для отмывания планшетов не менее 30 с;

- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Составить протокол маркировки лунок в соответствии со схемой 1. Лунки в дубликатах промаркировать следующим образом:

- ФП – фоновая проба;
- С₀ – С₅ – калибровочные пробы;

- КС – контрольная сыворотка;

- Х_i – образцы исследуемых сывороток крови человека.

Схема 1 Пример составления протокола для трех стрипов

	1	2	3
A	ФП	С3	Х1
B	ФП	С3	Х1
C	С0	С4	Х2
D	С0	С4	Х2
E	С1	С5	Х3
F	С1	С5	Х3
G	С2	КС	Х4
H	С2	КС	Х4

8.2 Планшет один раз промыть раствором для промывания планшета (п. 6.5) с экспозицией раствора в лунках планшета в течение (30-40) с, удалить раствор с помощью промывателя, удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3 Во все лунки планшета внести по 0,150 мл буферного раствора для разведения.

8.4 Отобрать из каждой микропробирки с калибровочными пробами по 0,025 мл раствора и внести в соответствующие лунки по схеме 1.

Из пробирок, маркированных КС ' и Х ', отобрать по 0,025 мл раствора и внести в соответствующие лунки по схеме 1.

8.5 Планшет закрепить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать при температуре (18-25) °С в течение 40 мин при непрерывном встряхивании на встряхивателе для планшетов.

8.6 Удалить содержимое из всех лунок с помощью промывателя, затем планшет промыть 4 раза раствором для промывания планшета и удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге (п. 8.2).

8.7 Во все лунки, кроме лунок, маркированных ФП, внести по 0,150 мл конъюгата в рабочем разведении (п.6.6).

8.8 Повторить стадию инкубации по п.8.5.

8.9 Удалить содержимое из всех лунок с помощью промывателя, затем планшет промыть 5 раз раствором для промывания планшета и удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге (п. 8.2).

8.10 В каждую лунку планшета внести по 0,150 мл раствора проявителя (п.6.7).

8.11 Планшет закрепить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать при комнатной температуре (18-22)°С в защищенном от света месте в течение 15 мин.

8.12 Остановить реакцию путем внесения во все лунки планшета по 0,1 мл стоп-реагента.

8.13 Встряхнуть планшет на встряхивателе для планшетов и, не позже чем через 1мин после остановки реакции, определить ОП раствора в лунках при длине волны 450 нм.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1 Рассчитать средние арифметические значения ОП, в ОЕ, для каждой пары лунок, содержащих ФП, калибровочные пробы – В₀ – В₅, контрольную сыворотку – В_{КС}, исследуемые образцы сыворотки крови – В_Х.

Если фотометр не позволяет вычитать величину ОП ФП_{ср}, необходимо пользоваться формулой (В₀-ФП_{ср}), где ФП_{ср} – среднее арифметическое значение ОП фоновой пробы.

Результаты учитывают только при соблюдении следующих условий

- В₀ не должно превышать 0,2 ОЕ;

- В₅ не должно превышать 3,2 ОЕ.

На основании полученных данных определить соответствие в ряду неравенств В₀<В₁<В₂<В₃<В₄<В₅, в ОЕ.

9.2 Построить калибровочную кривую в линейных или полупологарифмических координатах, откладывая на оси ординат значения ОП, в ОЕ, а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентрации анти-ТГ, в МЕд/мл, в соответствующих калибровочных пробах.

9.3 Определить по калибровочному графику содержание анти-ТГ, в МЕд/мл, в КС и в исследуемых образцах сыворотки крови человека.

10 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

10.1 Специфичность

В наборе ИФА-АНТИ-ТГ при изготовлении иммуносорбента используют высокоочищенный тиреоглобулин, что обеспечивает высокую специфичность анализа.

10.2 Чувствительность

Минимальная концентрация анти-ТГ, достоверно определяемая с помощью набора, составляет не более 10 МЕд/мл.

10.3 Воспроизводимость результатов

Коэффициент вариации результатов определений (n=10) концентрации анти-ТГ в образцах сыворотки крови с низким, средним и высоким содержанием анти-ТГ с использованием набора не превышает 10 %.

10.4 Тест на "открытие"

Процент "открытия" анти-ТГ, добавленных в образцы сыворотки крови с известной концентрацией анти-ТГ, составляет (80-120) %.

10.5 Клиническая проверка набора

Концентрация анти-ТГ в сыворотке крови здоровых лиц обоего пола (n=100), определенная с помощью набора ИФА-АНТИ-ТГ, составила (0-50) МЕд/мл в 98 % случаев, концентрации анти-ТГ выше 100 МЕд/мл не было выявлено.

10.6 Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить значения концентрации анти-ТГ соответствующие нормальным.

11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

11.1 Хранение набора должно производиться в чистом, сухом помещении при температуре (2-8)° С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до 25° С не более 3 сут.

11.2 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

11.3 Срок годности набора – 6 месяцев.

Приложение А (Информационное) Библиография

- [1] Приказ № 66 от 20.04.93 г.
О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь
- [2] Приказ №351 от 16.12.98г.
Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД
- [3] ОСТ 42-21-2-85
Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы